

OPTIMASI PCR DAN AMPLIFIKASI ITS DNA RIBOSOMAL *Penicillium* sp.LBKURCC29 DAN LBKURCC30 PENGHASIL SELULOSA ISOLAT HUTAN PRIMER GAMBUT CAGAR BIOSFER BUKIT BATU RIAU

Arfa Dewi*, Fajar Restuhadi dan Titania T. Nugroho

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau
Kampus Binawidya KM 12,5 Simpang Baru Pekanbaru, 28293, Indonesia
Email: arfa_dewi@ymail.com

Abstrak

Penicillium sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 merupakan kultur *Penicillium* sp. penghasil selulosa isolat dari tanah hutan primer gambut kawasan pangkalan bukit cagar biosfir Giam Siak Kecil Kec. Bukit Batu, Riau. Isolat fungi ini diisolasi DNANYa menggunakan kit wizard genomic DNA purification (promega). Hasil ekstraksi DNA kemudian dielektro-foresis menggunakan gel agarosa 0,8% dan diamplifikasi rDNANYa menggunakan *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Optimasi PCR untuk menghasilkan produk sangat berpengaruh pada suhu *annealing*. LBKURCC29 dan LBKURCC30 memiliki suhu *annealing* 47⁰C. Optimasi suhu *annealing* ini dapat dilihat dari pita yang diperoleh di bawah UV transiluminator setelah produk amplifikasi PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1,2%. Optimasi ini perlu dilakukan supaya diperoleh produk amplifikasi PCR ITS rDNA yang cukup baik untuk menghasilkan sekuens DNA yang optimal untuk analisis filogenetik.

Kata kunci: *Isolasi DNA, Penicillium sp, Polimerase Chain Reaction (PCR).*

PENDAHULUAN

Penicillium sp. merupakan fungi yang berhasil diisolasi dari tanah hutan gambut biosfir Giam Siak Kecil kecamatan Bukit Batu (GSKBB) provinsi Riau. Cagar biosfer ini memiliki kekayaan flora dan fauna yang melimpah termasuk jenis fungi yang belum teridentifikasi dengan jelas. Saat ini terdapat 195 jenis tumbuhan dan 173 jenis pohon (LIPI, 2007). Isolat *Penicillium* sp. yang berhasil diisolasi dari GSKBB tersebut disimpan pada koleksi jamur Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Riau.

Identifikasi *Penicillium* sp. berdasarkan morfologinya di tingkat spesies sulit dilakukan. Identifikasi ini biasanya dilakukan pada kondisi media, waktu inkubasi, dan suhu yang terstandarisasi. Morfologi mikroskopik, termasuk diameter koloni, warna konidia, dan pigmen koloni dapat digunakan untuk identifikasi di tingkat genus. Identifikasi

secara morfologi ini tidak bisa dilakukan pada tingkat spesies dan dapat menimbulkan kesalahan. Verifikasi hasil pemeriksaan morfologi dan identifikasi fungi di tingkat spesies, dapat dilakukan dengan analisis filogenetik menggunakan sekuens ITS-1 dan ITS-2 gen DNA ribosomal (rDNA) lainnya. Dalam banyak kasus, data sekuens dan hubungan filogenetik memungkinkan identifikasi pada tingkat spesies (Wiese dkk, 2011).

Hasil penelitian yang dilakukan Ismet (2012), *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 merupakan isolat fungi yang disolasi dari hutan gambut primer Pangkalan Bukit Kawasan Cagar Biosfir Giam Siak Kecil Bukit Batu, Riau sebagai fungi penghasil CMCase dengan kode galur LBKURCC29 dan LBKURCC30 yang diidentifikasi secara morfologi sampai pada tingkat genus. Namun belum dilakukan penelitian lebih lanjut

mengenai identifikasi isolat tersebut hingga pada tingkat spesies dan juga belum diidentifikasi hubungan kekerabatan dengan spesies fungi *Penicillium sp.* lainnya. Sehubungan dengan hal ini perlu dilakukan suatu identifikasi yang tepat berdasarkan sekuens DNA ribosomal pada daerah ITS (*Internal Transcribe Spacer*) yang dilengkapi dengan analisis filogenetik mengenai fungi tersebut. Wiese dkk., (2011) mengatakan bahwa untuk mengidentifikasi tingkat spesies fungi dapat digunakan sekuens daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNAnya.

BAHAN DAN METODE

Alat yang digunakan *Autoklaf All American Electric* model 1925/KY-23D, *Vortex Mixer H-VM-300*, *Thermostat controlled waterbath shaker* merek Sibata (WS-120) dan merek GFL-1092 Jerman, *UV Transimulator*, mesin sekuensing model 3100/3130XL-17215-029 (Lembaga Eijkman), unit gel elektroforesis horizontal, *Sentrifuge model Biofugo Pico Heraous* (Germany), *shaker Heidolph* model UNIMAX 1010, *PCR machine Thermal Cycler Techne TC-312*, *Camera Digital Sony super steadyshop DSC-W80* 7,2 Megapixel, dan peralatan gelas lain yang digunakan sesuai prosedur kerja.

Bahan-bahan yang digunakan adalah Kultur *Penicillium sp.* LBKURCC29 dan LBKURCC30 koleksi laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Riau yang diisolasi dari tanah hutan gambut cagar Biosfir GSKBB, Enzim Litikase keluaran SIGMA-Aldrich *Chemical Co. St. Louis*, USA (Nomor catalog L-2524), *Ethidium Bromide* keluaran Bio-rad, 10 mg/mL (nomor katalog 161-0433), 1 kb DNA *Ladder* keluaran Promega, Madison, USA (Nomor catalog G-5711) sebagai standar DNA, *Kit Wizard Genomic Purification* keluaran Promega, Madison, USA (No. catalog A-1120), *Go Taq™ PCR core system* keluaran Promega, USA (Nomor catalog M7660), primer-primer amplifikasi PCR, ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 dan ITS5 produksi PT. Sentra Biosains Dinamika, Jakarta berdasarkan sekuens yang dipublikasi oleh White dkk., (1990), dan bahan

kimia preparatif lainnya sesuai prosedur kerja.

Isolasi DNA dengan metode *kit Wizard ex Promega Corp* (Madison, USA)

Kultur *Penicillium sp.* LBKURCC30 telah diisolasi dari tanah hutan gambut primer di daerah siak kecil kec. Bukit Batu Riau ditumbuhkan pada media PDA selama 3 hari. DNA diisolasi dari 300 mg miselia fungi yang telah dibiakkan, dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 mL, ditambahkan 293 µL 50 mM EDTA (pH 8) dan enzim litikase (200 mg/mL) kemudian dihomogenkan dengan pipet naik turun.

Diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, didinginkan pada suhu kamar dan disentrifuga 13000xg selama 2 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambahkan 300 µL *Nuclei lysis Solution* dan dipipet naik turun untuk mencampur larutan. Setelah itu ditambahkan 100 µL *Protein Precipitation Solution* diaduk dengan menggunakan vortek pada kecepatan tinggi selama 20 detik. Sampel didiamkan di es selama 5 menit dan disentrifuga 12000xg selama 3 menit. Endapan dibuang kemudian supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga yang berisi 300 µL iso-propanol pada suhu kamar.

DNA disentrifuga 13000xg selama 5 menit. Supernatan didekantasi dan pelet DNA dikeringkan dengan membalikkan tabung di atas tisu, ditambahkan 300 µL etanol 70% dan tabung dibalikkan untuk mencucinya. Pelet disentrifuga 13000xg selama 5 menit, Pelet yang ada dalam tabung dikeringkan kembali dengan membiarkan terbuka di udara selama 10-15 menit, ditambahkan 25 µL larutan dehidrasi DNA dan 0,5 µL larutan RNase dan dipipet naik turun serta diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit untuk menghilangkan RNA. Sampel diinkubasi lagi pada suhu 65°C selama 1 jam dalam waterbath dengan sesekali dengan memukul dasar tabung pelan-pelan untuk melarutkan DNA.

Elektroforesis isolat DNA menggunakan gel agarosa 0,8%

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa yang dilarutkan dalam buffer TAE dengan perhitungan tertentu kemudian dipanaskan lalu dituang. Isolat DNA dielektroforesis dengan volume total 10 μL (6 μL sampel dicampur 3 μL loading bufer dan akuades steril 1 μL), sedangkan untuk DNA standar volumenya 6 μL (5 μL DNA ladder +1 μL loading dye). Setelah migrasi DNA selesai, gel yang mengandung pita DNA tersebut direndam dengan larutan ethidium bromide 15 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ (EtBr₃ 10 mg/mL dicampur bufer TAE 1x) selama 30 menit sambil digoyang perlahan pada *shaker* kemudian dibilas dengan akuades. Gel yang mengandung pita DNA diamati menggunakan sinar UV pada transiluminator dan difoto dengan kamera digital merk *Sony*. Pita-pita DNA sampel yang terlihat diukur jarak migrasi-nya.

Penentuan berat molekul (BM)

Berat molekul DNA fungi *Penicillium sp.* dapat ditentukan menggunakan DNA standar yang telah diketahui berat molekulnya (1 kb DNA Ladder, Promega) dan mengelektroforesis pada gel agarosa dalam waktu yang bersamaan dengan DNA sampel. Hubungan jarak migrasi dan fungsi ¹⁰log pasangan basa DNA standar dapat dibuat dalam bentuk grafik. Grafik ini menghasilkan persamaan regresi linear, $y = ax + b$, $y = \log \text{BM}$, $x = \text{jarak migrasi DNA sampel (cm)}$ yang digunakan untuk menentukan berat molekul DNA sampel yang dinyatakan dalam satuan pb (pasangan basa).

Primer dan PCR

Bagian rDNA yang mengandung ITS-1 dan ITS-2 dan gen 5.8S rRNA diamplifikasi dengan menggunakan primer ITS4 dan ITS5. Amplifikasi dilakukan dalam volume total 50 μL yang mengandung 3 μL isolat DNA fungi *Penicillium sp.* LBKURCC29 dan LBKUR-CC30, 10 μL primer ITS4, 10 μL

ITS5, 5 μL dNTP 2 mM, 5 μL bufer+MgCl₂, 16,5 μL H₂O dan 0,5 μL Taq DNA Polimerase. Reaksi diawali dengan denaturasi selama 5 menit, diikuti 35 siklus pada suhu 95°C, 1,5 menit pada suhu 94°C, 1 menit pada suhu 45°C, dan 3 menit pada suhu 72°C pada alat *Thermal cycler model thermo electron PCR sprint*. Reaksi berakhir dengan pemanjangan rantai final selama 5 menit pada suhu 72°C. Hasil PCR dianalisis secara elektroforesis dengan gel agarosa 1,2% dalam bufer TAE 1X diwarnai etidium bromida dan difoto pada sinar UV transiluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA *Penicillium sp.* LBKURCC30 diisolasi dari miselium berumur 3 hari. Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode *kit Wizard ex Promega Corp.* Adanya pita DNA tunggal yang terlihat jelas dengan bantuan sinar UV pada gel elektroforesis menunjukkan bahwa DNA fungi ini telah berhasil diisolasi (Gambar. 1) kemudian dielektroforesis dan dilanjutkan amplifikasi PCR.

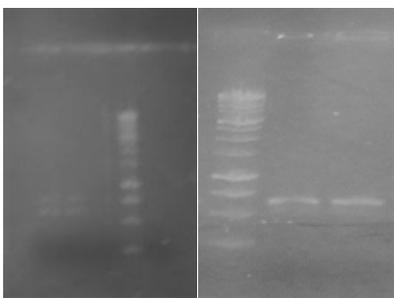
Data migrasi DNA standar dan isolat dapat dibuat grafik yang menunjukkan hubungan antara log pasangan basa dengan jarak migrasi pita yang terlihat. Persamaan yang diperoleh dari grafik tersebut adalah $y = -0,3243x + 4,9703$. Dari persamaan ini diperoleh jumlah pasangan basa atau berat molekul DNA kromosomal *Penicillium sp.* LBKURCC29 dan LBKURCC30 masing-masing 14432 pb dan 13247 pb.

Amplifikasi PCR isolat DNA pada daerah ITS-1 dan ITS-2 dilakukan dengan menggunakan primer ITS4 dan ITS5. Hasil PCR menunjukkan bahwa produk PCR isolat DNA yang diamplifikasi menggunakan suhu *annealing* 45°C dan 47°C memperlihatkan pita yang berbeda (Gambar 1a dan 1b). Pada suhu *annealing* 45°C berupa pita ganda yang menunjukkan bahwa pada suhu ini belum tepat untuk menghasilkan produk yang baik. Hal ini dikarenakan untuk melihat ke-

berhasilan produk PCR ditandai dalam pita yang berbentuk tunggal yang spesifik menunjukkan bahwa primer yang digunakan cocok untuk untuk amplifikasi DNA ribosomal suatu DNA. Pada suhu 47°C, produk PCR menunjukkan pita DNA berbentuk tunggal. Pita ini cukup baik untuk melihat produk PCR yang berhasil diamplifikasi.

Jika pita hasil PCR lebih dari satu, ini menunjukkan terjadinya *non-specific annealing*. oleh karena itu suhu *annealing* perlu ditingkatkan. Jika tidak diperoleh pita hasil PCR maka suhu *annealing* perlu ditingkatkan, maka suhu *annealing* diturunkan dan digunakan pasangan primer yang sesuai.

Pasangan primer ITS1 dan ITS4 juga diujikan, tetapi tidak menghasilkan pita DNA meskipun suhu *annealing* diturunkan. Beberapa faktor yang menyebabkan ada-lah ketidakcocokkan primer dengan DNA target dan suhu *annealing* yang digunakan.



Gambar 1.a). Produk PCR *Penicillium sp.* LB-KURCC29 dan LBKURCC30 suhu *annealing* 45°C,

b). Produk PCR *Penicillium sp.* LB-KURCC29 dan LBKUCC30 suhu *annealing* 47°C.

Pasangan primer ITS1 dan ITS4 juga diujikan, tetapi tidak menghasilkan pita DNA meskipun suhu *annealing* diturunkan. Beberapa faktor yang menyebabkan ada-lah ketidakcocokkan primer dengan DNA target dan suhu *annealing* yang digunakan.

Daerah target amplifikasi rDNA dimiliki oleh berbagai spesies jamur. Jamur *Penicillium sp.* LBKURCC29 dan LBKUR-

CC30 memiliki daerah target amplifikasi sesuai dengan peta posisi primer yang dirancang oleh White dkk., (1990). Jumlah pasangan basa pada daerah ITS-1 dan ITS2 menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS4 sekitar 602. Untuk pasangan primer ITS5 dan ITS4 pada *Penicillium sp.* LBKURCC29 dan LBKURCC30 diperoleh masing-masing 540 pb dan 652 pb. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah pasangan basa pada rDNA *Penicillium sp.* mendekati target amplifikasi pada daerah ITS-1 dan ITS-2.

KESIMPULAN

Suhu *annealing* yang tepat pada proses PCR sangat menentukan suatu isolat DNA untuk berhasil diamplifikasi. Suhu 47°C merupakan suhu yang tepat untuk amplifikasi PCR isolat DNA *Penicillium sp.* LBKURCC29 dan LBKUR-CC30 yang ditunjukkan dari pita yang diperoleh setelah proses elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,2%. Berat molekul DNA kromosomal *Penicillium sp.* LBKURCC29 dan LBKURCC30 masing-masing 14432 pb dan 13247 pb dan berat molekul untuk pasangan primer ITS5 dan ITS4 produk PCR diperoleh masing-masing 540 pb dan 652 pb. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah pasangan basa pada rDNA *Penicillium sp.* mendekati target amplifikasi pada daerah ITS-1 dan ITS-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Lembaga Penelitian Universitas Riau sesuai Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Program Penelitian Guru Besar 105/UN.19.2/PL/2012, berdasarkan DIPA Universitas Riau tahun 2012, Nomor: 0680/023-04.2.16/04/2012 atas nama Prof. Dr. Titania T. Nugroho.

DAFTAR PUSTAKA

- Gumbira, S. E., Syamsu, K., Mardliyati, E., Herryandie, A., Evalia, NA., Rahayu, DL., Puspitarini, R., Ahyatudin, A., Hadiwijoyo, A. 2009, *Agro Industri dan Bisnis Gambir Indonesia*. IPB Press, Bogor
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, Edisi II, terjemahan Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung
- Laksmono, Syahrul Amin, Galuh Widiyarti, M., Hanafi, Agus Haryono, 2011, Proses ekstraksi pada skala pilot dan telaah keekonomian pabrik ekstraksi katekin dari gambir, Disampaikan Pada *Lokakarya Pembangunan Ekonomi Pedesaan Melalui Pengembangan Komoditas Unggulan Daerah dan Alsintan*, Kemenko Bidang Perekonomian dan Pemda Sumbar, Padang, 14-15.
- Meyer, B. N., Feerigni, N, R., Putnam, J. E., Jacobson, L, B., Nicholas, D, E., dan McLaughlin, J, L., 1982, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, *Plant Medical*, **45**, 31-34.
- Nazir, M., 2000, *Gambir : Budidaya, Pengolahan dan Prospek Diversifikasinya*. Yayasan Hutanku, Padang